

University of Groningen

Substraatvoorziening van de oxidatieve fosforylering in geïsoleerde rattethymuskernen

Konings, Antonius Wilhelmus Theodorus

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1969

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Konings, A. W. T. (1969). *Substraatvoorziening van de oxidatieve fosforylering in geïsoleerde rattethymuskernen*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

S A M E N V A T T I N G

Door verschillende auteurs is aangetoond dat geïsoleerde thymuskernen, in tegenstelling tot kernen geïsoleerd uit lever, hart en nier, in staat zijn tot een oxidatieve fosforylering die gebonden is aan een ademhalingsketen. Eén van de verschillen met het mitochondriële proces is de onmogelijkheid om de ademhaling en de ATP synthese te stimuleren door het toevoegen van substraat. Een uitzondering in dit opzicht is een artikel van Betel en Klouwen (1963) waarin de stimulering van de ATP synthese door toevoeging van inosine wordt beschreven. Anderen (McEwen e.a. 1963c) stellen dat het energiemetabolisme van de kern afhankelijk is van de glycolyse. Vanwege de beperkte experimentele steun voor deze hypothese werd besloten de rol van koolhydraten als energiebron opnieuw te onderzoeken.

Het doel van de in dit proefschrift beschreven experimenten was de identificatie van het endogene substraat (substraten) nodig voor het functioneren van de oxidatieve kernfosforylering.

Een korte *inleiding* tot het onderwerp wordt gegeven in *Hoofdstuk I*.

In *Hoofdstuk II* wordt *structuur en biochemie van de celkern* beschreven. In lymfoïde weefsels, zoals thymus, wordt een relatief groot gedeelte van de cel door de kern ingenomen. Een aantal metabole activiteiten die gewoonlijk in de mitochondriën en in het cytoplasma plaats hebben worden bij deze cellen in de kern aangetroffen.

Hoofdstuk III bevat de *probleemstelling*. De mogelijke uitzonderingspositie van inosine als stimulator van de ATP synthese wordt in discussie gebracht. De discrepantie die bestaat tussen de mate van remming van de ATP synthese en de zuurstofopname tengevolge van monojoodacetaat, wordt nader beschouwd.

In *Hoofdstuk IV* worden de *methoden voor de isolatie van celkernen* gegeven en wordt de *zuiverheid van de kernpreparaten* besproken.

In *Hoofdstuk V* wordt het onderzoek naar het effect van *toegevoegde substraten op de glycolyse, de ademhaling en de ATP synthese* beschreven. De rol van glucose wordt vergeleken met die van inosine. Kernen die op

endogeen substraat worden geïncubeerd vertonen een constante zuurstofopname en een onveranderd ATP niveau gedurende het eerste uur. Hierna verliezen een groot aantal kernen hun metabole activiteit en komt anorganisch fosfaat vrij. De kernademhaling wordt niet beïnvloed door 2-deoxyglucose. Dit betekent dat hexosefosfaten niet in aanmerking komen als tussenproducten van de substraatafbraak en dat de zuurstofconsumptie niet in stand gehouden wordt door NADPH generatie via de hexose monofosfaat shunt. Toevoeging van glucose, pyruvaat of purinenucleosiden verhoogt de lactaat productie terwijl de ademhaling en de ATP synthese niet worden beïnvloed. Slechts 1 % van het ^{14}C merkteken van het verbruikte (6- ^{14}C)glucose wordt als $^{14}\text{CO}_2$ teruggevonden. Glucose wordt gedeeltelijk via de hexose monofosfaat shunt afgebroken. De oxidatie van NADPH lijkt hiervoor snelheidsbepalend te zijn.

In *Hoofdstuk VI* worden de resultaten van het onderzoek naar de betekenis van koolhydraten als endogene energiebron beschreven. De invloed van verschillende concentraties monoïoodacetaat op de productie van lactaat en $^{14}\text{CO}_2$ uit (6- ^{14}C)glucose is bestudeerd en vergeleken met de invloed op de zuurstofopname en de ATP synthese. Aange-toond wordt dat maximale remming van de lactaatproductie reeds wordt verkregen bij een concentratie van 0.05 mM monoïoodacetaat. Dit heeft geen effect op de ademhaling en de ATP synthese, de $^{14}\text{CO}_2$ ontwikkeling uit (6- ^{14}C)glucose is echter duidelijk verhoogd. Deze laatste waarneming wordt toegeschreven aan decarboxylatie van glucose-6-P via de hexose monofosfaat shunt, nadat het 1e en 6e koolstofatoom van glucose zijn verwisseld.

Uit deze experimenten wordt geconcludeerd dat de oxidatieve kernfosforylering niet afhankelijk is van een endogene koolhydraatbron.

In *Hoofdstuk VII* wordt nagegaan of endogene lipiden tijdens de aerobe incubatie geoxideerd worden. Er zijn in de literatuur geen gegevens over het gehalte aan lipiden en de samenstelling ervan bekend. Extractie van de kernsuspensies levert 2.2 ± 0.2 mg lipide per mg DNA P op (fosfolipiden 65 %, neutrale lipiden 29 %). Na verwijdering van het buitenmembraan van de kern (samen met de cytoplasmatische verontreinig-

gingen). door een detergens (saponine) kan 1.2 ± 0.1 mg lipide worden geëxtraheerd. Neutrale lipiden blijken een integraal deel van de kern uit te maken. Na het ontwikkelen van een techniek waarmee kernen geïsoleerd kunnen worden die met ^{14}C in verschillende lipidenfracties zijn gemerkt, is aangetoond dat $^{14}\text{CO}_2$ ontwikkeling plaats vindt tijdens aerobe incubatie van de kernsuspensies. Er werd een laag ademhalingsquotient gevonden (0.80 ± 0.05), hetgeen eveneens een aanwijzing is voor vetzuuroxidatie. De, uit de zuurstofopname berekende, hoeveelheid lipide die geoxideerd zou worden tijdens 1 uur incubatie op een endogene lipidebron blijkt van dezelfde orde van grootte te zijn als de hoeveelheid die uit de $^{14}\text{CO}_2$ ontwikkeling kan worden bepaald. De oxidatie van lipiden en de opname van zuurstof worden door oligomycine, antimycine A en monojoodacetaat in dezelfde mate geremd. Door ontkoppeling van de ademhaling door 2,4-dinitrofenol worden zowel de ademhaling als de endogene vetzuuroxidatie verhoogd. Er zijn aanwijzingen dat de vetzuren die geoxideerd worden hoofdzakelijk afkomstig zijn van fosfatidylcholine.

Geconcludeerd wordt dat in geïsoleerde rattethymuskernen de endogene vetzuuroxidatie een belangrijk energie-leverend proces is voor de oxidatieve fosforylering.

It has been established that isolated thymus nuclei are, in contrast to nuclei isolated from liver, heart or kidney, capable of a respiratory-chain-linked oxidative phosphorylation. One of the differences with the mitochondrial process is the impossibility to stimulate respiration and ATP synthesis by adding substrate. An exception, in this respect, is a report (Betel and Klouwen 1963) of stimulation of ATP synthesis by adding inosine. Others (McEwen et al. 1963c) state that nuclear energy metabolism depends on glycolysis. Because of the limited experimental support for this hypothesis it was decided to reconsider the role of carbohydrate as an energy source for nuclear metabolism.

The purpose of the experiments described in this thesis has been the identification of the endogenous substrate(s) by which nuclear oxidative phosphorylation is driven.

A short *introduction* to the subject is given in *Chapter I*.

In *Chapter II* the *structure and biochemistry of the cell nucleus* is described. In lymphatic tissues, e.g. thymus, a relatively large part of the cell is occupied by the nucleus. A number of metabolic activities usually found in the mitochondria and the cytoplasm take place in these nuclei.

In *Chapter III* the *problems* involved are inumerated and described. The exclusivity of inosine as a stimulator of ATP synthesis is questioned. The discrepancy between the degree of inhibition by iodoacetate of ATP synthesis and of oxygen consumption is discussed.

In *Chapter IV* the *methods for the isolation* of cell nuclei are given. The *purity of the nuclear preparations* is discussed.

In *Chapter V* the effect of *added substrates on glycolysis, respiration* and ATP synthesis is investigated and the role of glucose is compared to that of inosine. Nuclei incubated on endogenous substrate show a constant oxygen consumption and ATP level during the first hour. After this a large number of nuclei loose inorganic phosphate and be-

come metabolically inactive. Nuclear respiration is not affected by addition of 2-deoxyglucose. This indicates that hexosephosphates can not be regarded as intermediates of substrate breakdown and that oxygen consumption is not maintained by NADPH generation via the hexose monophosphate shunt. Addition of glucose, pyruvate or purine ribonucleosides to nuclear suspensions enhances lactate production while respiration and ATP synthesis are not affected. Only 1 % of the ^{14}C label of (6- ^{14}C)glucose taken up is recovered as $^{14}\text{CO}_2$. Glucose is partly catabolized via the hexose monophosphate shunt. The oxidation of NADPH seems to be rate-limiting.

In *Chapter VI* the results of the study of the *significant of carbohydrate as an endogenous energy source* are given. The influence of iodoacetate in various concentrations on the production of lactate and $^{14}\text{CO}_2$ from (6- ^{14}C)glucose was investigated and compared with the effect on oxygen consumption and on ATP synthesis. It is shown that the largest degree of inhibition of lactate production is already obtained by the addition of 0.05 mM iodoacetate. This concentration of the inhibitor of glycolysis does not have any effect on respiration nor on the level of ATP. The production of $^{14}\text{CO}_2$ from (6- ^{14}C)glucose is, however, clearly increased. The latter phenomenon is attributed to decarboxylation of glucose-6-P by the hexose monophosphate shunt, the carbon atom in the sixth position of glucose having been transferred to the first position.

From the experiments described in this chapter it is concluded that nuclear oxidative phosphorylation does not depend on an endogenous carbohydrate source.

Chapter VII considers *endogenous lipid oxidation*. No data on lipid content nor on lipid composition of thymus nuclei are available from the literature. Extraction of the nuclear suspensions yields 2.2 ± 0.2 mg lipid per mg DNA P (fosfolipids 65 %, neutral lipids 29 %). After removal of the outer nuclear membrane (together with attached cytoplasmic contaminations) by a detergent, saponin, 1.2 ± 0.1 mg lipid could be extracted. Neutral lipids appear to be an integral part of rat thymus nuclei. After the development of a technique which yields nuclei labeled

with ^{14}C in several lipid components, it has become possible to demonstrate that $^{14}\text{CO}_2$ is produced during aerobic incubation. The low respiratory quotient of the isolated nuclei (0.80 ± 0.05) also indicates fatty acid oxidation. The calculated amount of total lipid which needs to be oxidized to account for one hour of endogenous respiration on a lipid source, is very close to that obtained from $^{14}\text{CO}_2$ production. Lipid oxidation is inhibited by oligomycin, antimycin A and iodoacetate to a degree comparable with the inhibition of respiration. Uncoupling of respiration by 2,4-dinitrophenol enhances both respiration and endogenous fatty acid oxidation. Evidence is given that the fatty acids oxidized are derived mainly from phosphatidylcholine.

It is concluded that endogenous fatty acid oxidation is a principal energy-donating process in nuclear oxidative phosphorylation.